

腸管出血性大腸菌を中心とした腸管感染菌の病原性ゲノム基盤の 解明と臨床応用

●林 哲也¹⁾ ◆小椋 義俊¹⁾ ◆大岡 唯祐²⁾ ◆戸邊 亨³⁾ ◆桑原 知巳⁴⁾

1) 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 2) 宮崎大学医学部 3) 大阪大学大学院医学系研究科 4) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス部

<研究の目的と進め方>

種々の細菌感染症の中でも、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、我が国を含む先進諸国で最も問題となっている腸管感染症である。EHEC は O157 EHEC と non-O157 EHEC に大別されるが、前者の方が分離頻度も高く、ゲノム配列が決定されたこともあって、EHEC 研究は O157 を中心に進んできた。しかし、non-O157 EHEC の分離頻度も増加しており、その対応も必要になっている。本研究では、これまで我々が進めてきた O157 堺株の全ゲノム情報に基づいた O157 の病原性とゲノム多様性の解明を更に推進するとともに、O26・O111・O103 EHEC を新たな解析対象とし、EHEC の病原性メカニズム、ゲノム多様性、病原性発現調節機構の解明に取り組む。また、他の腸管病原性大腸菌とのゲノム比較を行い、EHEC の病原性の特性を浮き彫りにする。さらに、腸管常在細菌の解析と EHEC と常在菌の相互作用の解析を行う。特に、本特定領域研究の後半 2 年間は、腸管常在細菌の解析に重点を置いて研究を進め、ヒト腸管常在細菌叢の実体を明らかにするとともに、EHEC の増殖や病原性発現に対する常在菌の作用を明らかにする。これらの研究成果を基に、EHEC の新しい診断・サーベイランス・治療・予防法の開発を目指す。なお、腸管常在細菌解析のより効率的遂行のため、本年度より班構成を一部変更 (徳島大学・桑原の参加) した。

<2008 年度の研究の当初計画>

【EHEC の解析】(1) 病原性メカニズム：O157 では III 型分泌系 (T3SS) エフェクター群の機能解析を進める。non-O157 EHEC では決定したゲノム情報を基に O157 との病原遺伝子レパートリーの比較を行い、その結果を基に、各 non-O157 EHEC に特異的な TTSS エフェクター・付着因子に焦点をあてた機能解析を行う。non-O157 EHEC では、ウサギ等を用いた *in vivo* の病原性解析の有用性について検討する。(2) ゲノム多様性：pan-*E. coli* array と新型シーケンサーを用いて、より広範なゲノム多様性解析を行い、EHEC 病原性遺伝子レパートリーの多様性の実態を解明する。O121 EHEC のゲノム解読を新たに開始する。また、O26・O111 では、IS を標的とした迅速菌株識別システムを新たに構築し、新しいサーベイランス法として実用化を図る。本年度は、プロトタイプ構築が目標となる。(3) 病原性発現調節機構：タイリングアレイなどを用いて、T3SS を中心とした O157 病原遺伝子群の発現調節系の分子機構を解明し、外来性の EHEC 病原遺伝子群の大腸菌固有のゲノムシステムへの統合様式を明らかにする。

【他の病原性大腸菌と腸内常在菌の解析】(1) 他の病原性大腸菌：EPEC の代表菌株である B171 株と E2348/69 株の解析を進め、EHEC と EPEC の病原性の共通性と違いを明らかにする。O55:H7 のゲノム解析により、O55:H7 から O157 が出現した遺伝的イベントを明らかにする。(2) 腸内常在菌：主要な常在菌種の 1 つである *Bacteroides fragilis* で高度に発達している genome inversion system と荚膜合成系の解析を進め、腸内常在菌への寄与を明らかにする。また、他の腸内常在菌の個別ゲノム解析を、

基盤ゲノム・服部班や比較ゲノム・久原班らと共同で推進する。さらに、主要常在菌と O157 EHEC の相互作用、特に常在菌代謝産物の O157 EHEC の病原性発現に対する影響や増殖阻害作用を解明し、新しい EHEC 治療・予防戦略開発への展開を図る。

<2008 年度の成果>

【EHEC】(1) O157 において、タイリングアレイを用いた Pch および Ler タンパク質のゲノム結合部位の解析を行い、Pch が T3SS 遺伝子群などの外来性遺伝子領域に選択的に結合し、発現を制御していること、さらに T3SS 遺伝子群を中心とした病原性関連遺伝子群の発現がこの 2 種類の制御因子により協調的な発現制御ネットワークを形成していることを明らかにした。(2) NleH, EspL2 などのエフェクターの機能を明らかにした。NleH は感染細胞での炎症応答を修飾し、EHEC の感染により抑制される応答をある程度上昇させ、応答レベルを調節する。EspL2 は上皮細胞の細胞骨格の再編成と付着に関与する因子であり、宿主細胞の annexin 2 と直接相互作用し、その F-アクチン凝集活性を亢進するとともに細胞膜の形態変化を誘導し、細胞上での密集した集落形成に寄与する。(3) 既に決定済みの O26, O111, O103 の全ゲノム配列のアノテーション作業が終了し、これらの non-O157EHEC も O157 と同様に、多数のプロファージや integrative elements が存在しており、O157 と同一、あるいは非常に似た病原遺伝子群を持つ類似のエレメントを多数獲得することにより、異なった進化系統で同じ病原型の菌が出現するメカニズムを明らかにした (EHEC 平行進化機構の解明)。(4) O26 菌株のゲノム多様性解析を行い、O157 に比べてややマイルドであるが、ファージ領域が顕著な多様性を示すこと、また、IS の分布状況の解析から、O157 で作成したものと類似の迅速菌株識別系を開発できる可能性があることが明らかになった。

【他の病原性大腸菌と腸内常在菌】(1) EPEC の代表菌株である B171-8 株の半網羅的菌株特異的領域の解析、E2348/69 株の全ゲノム解析 (英国・サンガーセンターとの共同研究) を行い、T3SS 系の全貌など、それぞれの基本的な病原遺伝子セットを同定した。また、E2348/69 株が最もシンプルな T3SS を持つこと、ETT2 にコードされる第二の T3SS が、B2 系統群以外の大腸菌株にのみ存在することなどの知見を得た。(2) 腸内常在菌の代謝産物が O157 の病原性発現制御に関与することを示す知見を得た。(3) 米国との共同研究により、O55・O157 系統の進化分化時期についての詳細を明らかにした。(4) 基盤ゲノム・服部班と共同で、2 株のヒト腸内常在大腸菌株のゲノム配列を決定した。1 株については、解析が終了し、論文発表もできた。(5) *B. fragilis* の保有する組み換え酵素群の網羅的な解析により、本菌のゲノムワイドな外膜蛋白質相変異に関与する tyrosine recombinase を同定した。また、無菌マウスを用いた定着試験より、SusC family の外膜蛋白質の相変異が腸管内への定着に必要であることを明らかにした。(6) 腸内難培養菌である segmented filamentous bacteria (SFB) のゲノム解析のため、SFB ノトパイオートマウスを作成し、無菌マウス腸管で増殖した後、SFB の

ゲノムを抽出し、ゲノム概要配列を得た。

<国内外での成果の位置づけ>

【EHEC】T3SS 遺伝子群を中心とした病原性関連遺伝子群の同定および調節因子の役割分担についての解析はこの分野での先駆けとなるもので、DNA Res に発表した論文は Faculty of 1000 に選出され高い評価を受けている。3種類の各 non-O157 EHEC ゲノムの決定により、主要な EHEC のゲノムは全て我々のグループで解読したことになる。

【他の病原性大腸菌と腸内常在菌】E2348/69 株の全ゲノム解析は EPEC としては最初のものであり、フォスミドマッピング等を利用した B171-8 株の解析も他に例を見ないアプローチである。E2348/69 株や O55/O157 系統の解析は、国際的な共同研究の成功例としても評価できる。また、近年、腸管常在菌の宿主腸管免疫への関与や肥満、糖尿病等の疾病との関連が国内外で大きく注目されており、さらに *B. fragilis* の莢膜多糖には免疫調節作用があることも報告され、本菌の表層分子の相変異メカニズムの解明は宿主腸管免疫を理解する上で重要な知見である。腸内難培養菌のゲノム解析は新規培養技術の開発や腸管内代謝ネットワークを理解する上で極めて重要であるが、まだ解析技術も十分に確立されておらず、今回我々が用いた手法は全く新しいアプローチである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

【EHEC】non-O157 EHEC のゲノム解析データのまとめに時間を要し、論文発表が遅れているが、まもなく投稿できる予定である。3株の O26 について、SOLiD による再配列解析を行ったが、従来のシーケンサーや他の新型シーケンサーと全く異なったスタイルのデータであるために、その処理が難しく、まだ十分なデータ抽出ができていない。今後、情報支援班の協力を受けて解析を進める予定である。また、ウサギを使った *in vivo* 解析に関しては Stx の影響の他、定着に問題があり、変異株の使用や他の動物の使用など、今後様々な工夫が必要である。

【他の病原性大腸菌と腸内常在菌】SFB のゲノム解析においては、SFB ノトバイオマスウの糞便より精製した DNA が多数の SFB クローン由来であり、一種のメタゲノムであるため、SNP や多くの indel が存在し、アッセンブルが難しい状況にある。現在 Fosmid ライブラリーを作成中であるが、AT-rich なゲノムのためクロニング効率も悪く、改良が必要である。

<今後の課題>

【EHEC】O26 の菌株識別システムに関しては、解像度の向上などを図る必要がある。現在フィニッシング段階にある、O121 EHEC の配列決定を終了し、他の EHEC との比較解析を行う。EHEC の病原性発現を調節する腸内細菌叢由来物質の解析に関しては、主要産生菌種の同定など、さらに詳細な解析を行う必要がある。

【他の病原性大腸菌と腸内常在菌】腸内常在大腸菌に関しては、その多様性の把握と潜在的な病原性の有無や菌株間での差異を明らかにするために、さらに敗血症由来菌株や動物腸管由来菌株を含めたさらに大規模なゲノム比較解析を行う必要がある。腸内常在菌に関しては、SFB のゲノム解読の終了、*Bacteroides* の腸管内への定着に必須な遺伝子群の同定、*Clostridium difficile* など疾病との関連が強い腸内常在菌と *Bacteroides* との細菌間相互作用の解析、主要なヒト腸管常在菌である *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* におけるゲノム改変技術の確立、などを進める必要がある。

<成果公表リスト>

1)論文/プロシーディング

1. 0901091554
Ogura, Y., Abe, H., Katsura, K., Kurokawa, K., Asadulghani M, Iguchi, A., Ooka, T., Nakayama, K., Yamashita, A., Hattori, M., and Tetsuya, H.: Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping, *J. Bacteriol.*, 190, 6948-6960 (2008).
2. 0901091656
Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., et al.: Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69, *J. Bacteriol.*, 191, 347-354 (2008).
3. 0901091937
Naito, M., Hirakawa, H., Yamashita, A., Ohara, N., Shoji, M., Yukitake, H., Nakayama, K., Toh, H., Yoshimura, F., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T., and Nakayama K.: Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis*, *DNA Res.*, 15, 215-225 (2008).
4. 0901091958
Nakayama K., Yamashita, A., Kurokawa, K., Morimoto, T., Ogawa, M., Fukuhara, M., Urakami, H., Ohnishi, M., Uchiyama, I., Ogura, Y., Ooka, T., Oshima, K., Tamura, A. Hattori, M. and Hayashi T.: The Whole-genome Sequencing of the *Obligate Intracellular Bacterium Orientia tsutsugamushi* Revealed Massive Gene Amplification During Reductive Genome Evolution, *DNA Res.*, 15, 185-199 (2008).
5. 0901091911
Oana, K., Kawakami, Y., Hayashi T., and Ohnishi, M.: A simple broad-spectrum protocol using labiase for bacterial cell lysis to prepare genomic DNA for pulsed-field gel electrophoresis analysis, *Microbiol. Immunol.*, (in press).
6. 0801251725
Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T. and Tobe, T.: Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 15:25-38 (2008)
7. 0901131112
Miyahara, A., Nakanishi, N., Ooka, T., Hayashi, T., Sugimoto, N., Tobe, T.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. *Cell Microbiol.* 11:337-350 (2009).
8. 0801220951
Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imahoji, H., Ichimura, M., Hayashi, T. and Shiota, H.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Cornebacterium macginleyi*, *J Clin Microbiol.* 46:527-532 (2008).
9. 0801241216
Kataoka, K., Ogasa, S., Kuwahara, T., Bando, Y., Hagiwara, M., Arimichi, H., Nakanishi, S., Iwasaki, T. and Ohnishi, Y.: Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats, *Dig Dis Sci.* 53:1601-1608 (2008).